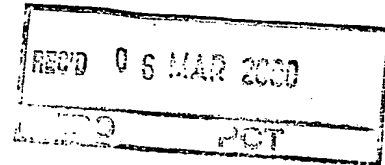


EP99/9781

ETV



09/868200

## Bescheinigung

Die EVOTEC BioSystems AG in Hamburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung  
unter der Bezeichnung

"Verfahren und Vorrichtung zur zellspurbasierten Zelluntersuchung"

am 14. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
A 61 B 10/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 20. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

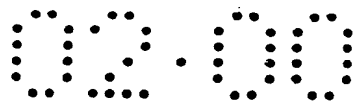
Kennzeichen: 198 57 692.7



## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Weihmayr



Tel.: (089) 52 40 01  
Fax: (089) 52 68 98  
e-mail: sombez@t-online.de  
ID/VAT DE 129730028

Patentanwälte  
Brienner Str. 52  
D-80333 München

Dr. Dieter v. Bezold  
Dipl. Ing. Peter Schütz  
Dipl. Ing. Wolfgang Heusler  
Dr. Oliver Hertz  
Europäische Patentanwälte  
European Patent Attorneys  
Mandataires Européens  
Zugelassen/admitted OHIM

v. B zold & Sozien, Brienner Str. 52 · D-80333 München

14692 Hz

EVOTEC BioSystems AG  
Schnackenburgallee 114  
D-22525 Hamburg

Verfahren und Vorrichtung zur  
zellspurbasierten Zelluntersuchung

**ZUSAMMENFASSUNG**

Zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, werden Zelluntersuchungen an den Zellspuren durchgeführt.

(Fig. 1)

14692 Hz

M 15.02.00

#### PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen, bei dem die Zellen (16, 76a, 76b) auf ein zumindest teilweise strukturiertes und/oder oberflächenmodifiziertes Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) aufgebracht werden und sich adhärent über Bahn-Oberflächenbereiche (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) des Substrats unter Erzeugung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) bewegen, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen, und Zelluntersuchungen an den Zellspuren durchgeführt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem zur Zelluntersuchung die Menge, die Geometrie, die chemische Zusammensetzung, die passiven elektrischen Parameter und/oder mechanische Eigenschaften der Zellspuren oder von deren Bestandteilen erfaßt werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Menge und Geometrie der Zellspuren Filamente (14a) und Membranflecken (14b) erfaßt werden.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einer Färbung oder Markierung zur Durchführung mikroanalytischer Verfahren unterzogen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem die mikroanalytischen Verfahren Fluoreszenzmessungen, Messungen auf der Basis von Isotopenmarkierungen oder Elementanalysen umfassen.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der Zusammensetzung der Zellspuren diese einem enzymatischen Abbau unterzogen werden.

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Zellspuren mit einem hochauflösenden Mikroskopverfahren untersucht werden.

8. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zytoplasmatische Rückstände oder genetischen Materialien in den Zellspuren erfaßt werden.

9. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem die Stabilität der Zellspuren bei mechanischen, elektrischen, akustischen, optischen und/oder chemischen Behandlungen erfaßt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung der passiven elektrischen Parameter der Zellspuren deren Impedanz, Durchschlagfestigkeit, nichtlineares Verhalten und/oder Erwärmung bei Stromdurchfluß erfaßt werden.

11. Verfahren gemäß Anspruch 2, bei dem zur Erfassung mechanischer Eigenschaften der Zellspuren deren Elastizität oder Plastizität erfaßt werden.

12. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vervielfachung von Bestandteilen der Zellspuren zur Erzeugung von Referenzmaterial durchgeführt wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellspuren in vorbestimmten Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) erzeugt werden, die zumindest teilweise zur verstärkten Anhaftung der Zellen mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind.

3 15.02.00

14. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Zellen nach der Erzeugung der Zellspuren einer medizinischen oder meßtechnischen Verwendung, einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterzogen werden.

15. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf einer Vielzahl paralleler Bahnen eine Vielzahl von Zellspuren erzeugt und untersucht werden.

16. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem auf sich kreuzenden Bahnen Zellspuren erzeugt und an Kreuzungsbereichen der sich kreuzenden Bahnen die gegenseitigen Wechselwirkungen der beteiligten Zellen und/oder Zellspuren untersucht werden.

17. Vorrichtung zur zellspurbasierten Untersuchung biologischer Zellen (16, 76a, 76b) mit einem Substrat (11, 31, 41, 51, 61, 71) mit Oberflächenbereichen (12, 52, 72), an denen die Zellen schlechter adhärieren als auf Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b), in denen die Zellen gut anhaften und sich adhärent bewegen können, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche zur Anhaftung von Zellspuren (14a, 14b, 34, 44) eingerichtet sind, die aus von den Zellen abgetrennten Materialrückständen bestehen.

18. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat in den Oberflächenbereichen (12, 52, 72) und/oder den Bahn-Oberflächenbereichen (13, 15, 17, 35, 45, 55, 57, 77a, 77b) strukturell und/oder chemisch modifiziert ist, um die Anhaftung von Zellspuren zu unterbinden bzw. zu fördern.

19. Vorrichtung gemäß Anspruch 17, bei der das Substrat Teil eines Mikrosystems ist, auf dem die Oberflächenbereiche und die Bahn-Oberflächenbereiche ausgebildet sind, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche mindestens eine gerade Bahn bilden.

20. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 19, bei dem das Substrat aus Glas, Silizium oder einem Kunststoff besteht.

21. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20, bei der eine Vielzahl von Bahn-Oberflächenbereichen in Form einer Gruppe paralleler Bahnen (57) oder sich kreuzender Bahnen (77a, 77b) gebildet sind.

22. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 17 bis 21, bei dem das Substrat zweiteilig ist, wobei die Bahn-Oberflächenbereiche auf einem der Substratteile angeordnet sind.

23. Verwendung von Materialrückständen, die von biologischen Zellen auf Substraten gebildet sind, zur Untersuchung von Eigenschaften der Zellen für medizinische, biochemische und/oder pharmakologische Zwecke.

14 15 02 00

14692 Hz

Verfahren und Vorrichtung zur  
zellspurbasierten Zelluntersuchung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung, insbesondere Zellassays oder Zell-Testanordnungen, deren Herstellung und Verfahren zu deren Verwendung.

In der Pharmakologie, Toxikologie und medizinischen Diagnostik nehmen zellbasierte Assays (Reaktionsansätze, Prüfansätze . dgl.) eine Schlüsselstellung ein. Gesucht werden rasch handhabbare und hochspezifische Untersuchungs- und Nachweisverfahren für biologische Zellen an sich oder für deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder mit natürlichen oder synthetischen Fremdsubstanzen. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, wenn die zum Nachweis einer Substanz, eines Zelltyps, einer Medikamentwirkung etc. benutzten Zellen wiederverwendbar (d.h. weiter kultivierbar) wären. Im medizinischen Bereich bedeutet das z.B. eine Rückführung in den Organismus des Spenders (z. B. eines Patienten) oder eines anderen menschlichen Empfängers. Für derartige Prozeduren werden jedoch neben der Sterilität sehr hohe Anforderungen daran gestellt, daß sich die Zelleigenschaften durch die Untersuchungen oder Analyse nicht verändern. So ist eine Markierung (z.B. für die Fluoreszenzerzeugung), wie sie bei der Immunofluorochromierung verwendet wird, ausgeschlossen, da die Folgereaktionen derart kontaminierter Zellen bei einer nachfolgenden Kultivierung oder im Empfängerorganismus nur schwer abschätzbar sind.

Es besteht ferner ein Interesse daran, Zelluntersuchungen spezifisch an Einzelzellen durchzuführen. Für ein statistisch abgesichertes Untersuchungsergebnis muß eine genügend hohe Zahl von Einzelzellen untersucht werden. Daraus ergibt sich ein Be-

darf an bisher nicht verfügbaren Paralleluntersuchungen an einer Vielzahl von Einzelzellen unter möglichst gleichartigen Bedingungen.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, extrem belastungsarme, auch für den medizinischen Bereich einsetzbare Verfahren und Vorrichtungen zur Zelluntersuchung zu entwickeln, die mit möglichst vielen bereits erprobten hochspezifischen Nachweistechniken, wie z.B. Immunofluorochromierung von Proteinen, Nukleotiden und Lipiden, als auch zerstörenden Verfahren wie z.B. Röntgen- oder Elektronenstrahlmikroanalyse kombiniert werden können und die parallele Untersuchung einer Vielzahl von Einzelzellen erlauben.

Diese Aufgabe wird durch Verfahren und Vorrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 bzw. 17 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht insbesondere darin, zur Untersuchung von biologischen Zellen oder deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen oder Substanzen zunächst auf einer Substratoberfläche Zellspuren der zu untersuchenden Zellen zu erzeugen und dann diese Zellspuren der gewünschten Analyse oder Untersuchung zu unterziehen. Die Erzeugung von Zellspuren durch adhärent auf Oberflächen wachsende oder sich bewegende Zellen ist an sich bekannt und wird beispielsweise von E. D. Hay et al. in "Exp. Biol. Med.", Bd. 10, 1985, S. 174 ff., beschrieben. Die Strukturen und Eigenschaften von Zellspuren werden unten unter Bezug auf die Figuren 2 und 3 erläutert. Die Erzeugung der Zellspuren erfolgt vorzugsweise unter Verwendung von Substratoberflächen, die zumindest teilweise in geeigneter Weise mikrostrukturiert und/oder modifiziert sind. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche ist insbesondere dazu vorgesehen, die Zellspurerzeugung in bestimmten Substratbereichen,



z.B. entlang bestimmter Pfade, zu fördern und in anderen Substratbereichen zu behindern oder auszuschließen. Die Oberflächenmodifizierung führt ferner dazu, daß nicht nur die auf natürliche Weise auf dem Substrat zurückbleibenden Materials Spuren untersucht werden können, sondern auch künstlich abgetrennte Materialrückstände (Erzielung größerer Spurmengen). Hierzu umfaßt die Substratmodifizierung insbesondere die Aufbringung von Molekülen, die Bindungsstellen anbieten, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül ankoppeln kann.

Die erfindungsgemäß eingesetzten Untersuchungsmethoden umfassen alle an sich zur Zelluntersuchung und Zellbehandlung bekannten Techniken, wobei sowohl zerstörungsfreie als auch zerstörende Techniken oder gegebenenfalls biochemische Verstärkungstechniken (z.B. PCR-Prozeß) eingesetzt werden können.

Die erfindungsgemäß verwendeten Substratoberflächen können aus synthetischem, anorganischem oder organischem Material bestehen oder auch durch biologisches Material gebildet werden.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Es wird erstmalig ein einzelzellspezifisches Verfahren zur Zelluntersuchung angegeben, bei dem die untersuchte Zelle durch den Untersuchungsvorgang unbeeinflusst und unverändert bleibt. Dies erlaubt eine erhebliche Erweiterung der Anwendung von Einzelzelluntersuchungen in der Pharmakologie, Toxikologie, medizinischen Diagnostik und Biochemie. Die Zelluntersuchung kann hochgradig parallel an einer Vielzahl von Zellen durch gleichzeitige Erzeugung vieler Spuren auf einem Substrat durchgeführt werden. Da durch die Mikrostrukturierung der Oberflächen eine Zuordnung einer Zellspur zu einer untersuchten Zelle (Spenderzelle) möglich ist, bleibt die hochparallele Einzelzelluntersuchung ebenfalls zellspezifisch. Die Mikrostrukturierung der Substratoberfläche kann vor-

zugswise nach Techniken erfolgen, wie sie an sich aus der Halbleiterprozessierung bekannt sind.

Erfindungsgemäß werden die Zellen außer durch die Spurenerzeugung durch keinerlei Färbungs- oder Markierungstechniken belastet. Sie sind damit nicht kontaminiert oder verändert und können einer medizinischen Verwendung bzw. einer Kryokonservierung oder einer weiteren Kultivierung unterworfen werden. Statt wie bisher in Zellen werden die Zellrückstände einer spezifischen Markierung oder Bewertung unterworfen. Diese kann durchaus auch zerstörend sein (z.B. schrittweiser enzymatischer Abbau) oder über Immunofluorochromierung in toxischen Konzentrationsbereichen erfolgen.

Weitere Ausführungsbeispiele und Vorteile der Erfindung werden im folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen

Fig. 1 den prinzipiellen Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurbasierten Systems (Ausschnitt),

Fig. 2 eine schematische Illustration der Grundstrukturen von Zellspuren in Form von Filamenten (A) und Membranflecken (B),

Fig. 3 eine Illustration der Wirkungsweise eines modifizierten Substrats,

Fig. 4 eine Illustration zur erfindungsgemäßen Fluoreszenzuntersuchung von Zellspuren,

Fig. 5 ein Ausführungsbeispiel der Erfindung, bei dem das in Fig. 1 illustrierte Grundprinzip mit einer Vielzahl paralleler Bahnen realisiert ist,

Fig. 6 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit einer Vielzahl paralleler Zellbahnen, und

Fig. 7 ein weiteres Ausführungsbeispiel der Erfindung mit sich kreuzenden Zellbahnen.

In Fig. 1 ist der prinzipielle Aufbau eines erfindungsgemäßen zellspurenbasierten Systems dargestellt. Ein Substrat 11 ist in seiner Oberfläche im  $\mu\text{m}$ - und  $\text{mm}$ -Bereich wie folgt strukturiert bzw. in seinen Oberflächeneigenschaften verändert.

Durch Bereiche 12 der Oberfläche, an denen Zellen nur schlecht adhärieren können, und Bereiche 13, 15, 17 (Bahn-Oberflächenbereiche), wo Zellen gut anhaften können, wird eine Vorzugsbahn gebildet, auf der sich eine Zelle 16 aktiv bewegen kann. Das Feld 15 im Bahn-Oberflächenbereich ist so modifiziert worden (chemisch, mechanisch etc.), daß hier die Zellen Teile ihrer Membran und inneren Bestandteile 14a, 14b verlieren, die am Substrat anhaften. Im gezeigten Beispiel sind es Filamente 14a und Membranflecken (oder Membranpatches) 14b, die unten unter Bezug auf die Fig. 2A und 2B im einzelnen erläutert werden. Die Zelle bewegt sich weiter in Richtung des Pfeiles 18. Die Zellspur kann nunmehr zerstörungsfrei oder zerstörend analysiert werden. Das zurückgelassene Material charakterisiert die Spenderzelle hinsichtlich der Membranzusammensetzung (Rezeptoren, Carrier, Lipide usw.), aber auch hinsichtlich innerer Bestandteile des Zytoplasmas, woraus sich medizinische, toxikologische, pharmakologische und andere Anwendungen ableiten lassen. Auf einer Bahn kann sich entweder eine oder mehrere Zellen bewegen und Spuren erzeugen.

Das Substrat 11 besteht beispielsweise aus Glas, Glimmer, anorganischem Kristallmaterial oder Halbleitermaterial. Die Substratoberfläche ist einerseits zur Ausbildung der Vorzugsbahn strukturiert bzw. modifiziert, auf der sich die Zelle bevorzugt

bewegt und Zellspuren hinterläßt. Die Oberflächenbereiche 12, an denen Zellen nur schlecht adhärieren können, tragen beispielsweise eine Beschichtung mit negativ geladenen Molekülen, vorzugsweise aus Polymeren mit möglichst vielen  $\text{OH}^-$ -Gruppen, wie z. B. Poly-HEMA. Beispiele für die Beeinflussung der Bereiche 13, 15, 17, in denen die Zellen gut anhaften können, werden unten gegeben. Andererseits umfaßt die Mikrostrukturierung und/oder Modifizierung der Substratoberfläche eine örtlich selektive Beeinflussung der Vorzugsbahn zwischen den Bereichen 12 der Substratoberfläche. Die Segmentierung der Vorzugsbahn z.B. in die Bereiche 13, 15 und 17 ist dazu vorgesehen, daß je nach der Gestaltung des jeweiligen Bereiches die Zellspuren besonders zahlreich oder besonders gering oder in Bezug auf eine bestimmte Zusammensetzung zurückgelassen werden. Dies wird auch aus den unten erläuterten Beispielen ersichtlich.

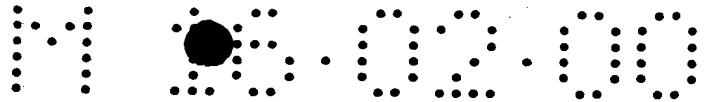
Die Mikrostrukturierung bzw. Modifizierung der Vorzugsbahn umfaßt beispielsweise:

1. Aufbringen von den molekularen Zellkontakt erhöhenden Schichten (z.B. Fibronectin, Polylysin, Alginate etc.). Die Schichtdicke kann anwendungsabhängig von der Dicke einer Moleküllage bis hin in den  $\mu\text{m}$ -Bereich gewählt werden. Die Molekülmonolagen werden vorzugsweise mit der Langmuir-Blodgett-Technik aufgebracht. Generell sind zur Schichtaufbringung auch Dickschichttechniken und/oder Plasmabehandlungen einsetzbar.
2. Nano- bzw. Mikrostrukturisierung von Oberflächen, d.h. Aufbringen von Mustern in nm- bzw.  $\mu\text{m}$ -Dimensionen, an denen Membranteile, insbesondere aber natürliche Kontaktmoleküle der Zelle, wie die der Integrin- und Catherinfamilie anhaften können (z.B. Strukturierung über die Photo- oder Elektronenstrahl-Lithographie).

### 3. Submikrometer und atomare Aufrauung oder Reliefbildung auf Oberflächen (kleinste Widerhaken etc.).

Die Substratbeschickung (Aufbringung der Zellen) erfolgt beispielsweise durch Aufspülen aus einer Suspension, beispielsweise durch einen Kanal des Mikrosystems, mit einem Manipulator (Kapillare, separates Mikrosystem oder optische Pinzette) oder auch durch aktives Aufwachsen.

Bei der Wanderung der Zellen über Substratoberflächen (z.B. über eine saubere Glasoberfläche) hinterlassen die Zellen unter physiologischen Bedingungen filamentöse oder fleckenartige Spuren, die im folgenden als Filament bzw. Membranfleck bezeichnet und unter Bezug auf die Fig. 2A bzw. 2B erläutert werden. Die Spuren sind in der Regel Strukturen, die membranumhüllt und mit Zellinhalten gefüllt sind. Typische Größen dieser Strukturen liegen in Bezug auf die Breite und Höhe im  $\mu\text{m}$ - und Sub- $\mu\text{m}$ -Bereich. Während die Länge eines Membranflecks in der Regel im wesentlichen seiner Breite entspricht, ist die Länge eines Filaments variabel. Die Filamentlänge kann bis zu einige Millimeter betragen. Die interessierenden Bestandteile der Zellen, die auch in den Zellspuren auffindbar sind, sind Membranproteine 210, Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212, Zytoplasmabestandteile 213, 214 und die Lipide 215 in der Membran (s. Fig. 2A). Bei den Membranflecken treten neben diesen Bestandteilen, die in Fig. 2B z.B. die Membranproteine 220 und die Lipidzusammensetzung 225 umfassen, ferner Vesikeln 221, Organellen 222 und genetisches Material 223 auf. Außerdem ist auch Zytoplasma 224 vorhanden. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde erstmalig festgestellt, daß die Zellspuren analysfähiges Material, das u.a. die genannten Bestandteile umfaßt, in ausreichender Menge enthalten. Dies bedeutet, daß die an sich bekannten Analyse- oder Untersuchungsverfahren vorteilhafterweise ohne gesonderte Anreicherungs-schritte implementiert werden können.



Die Oberflächenproteine und -rezeptoren 211, 212 umfassen beispielsweise ein Spurenprotein 211 in der Membran und einen angekoppelten Rezeptor 212 mit einer chromophoren Gruppe. Vom Rezeptor 212 wird bei geeigneter Lichtanregung Fluoreszenzlicht ausgestrahlt, das das Vorhandensein des Spurenproteins 211 anzeigt. Da die Rezeptorankopplung proteinspezifisch erfolgt, kann mit dem Fluoreszenzlicht der in der Spur vorhandene Proteinkomplex nachgewiesen werden.

In analoger Weise lassen sich auch andere Nachweistechiken implementieren, wie sie beispielsweise bei den ELISA- und RIAS-ssays vorgesehen sind.

Erfindungsgemäß erfolgt somit an den Zellspuren der spezifische Nachweis bestimmter Bestandteile der Spenderzelle. Die Bestandteile können auf der Oberfläche oder im Inneren der Zellspuren angeordnet sein. Im letzteren Fall ist vorgesehen, die Membran der Zellspur mit geeigneten Lösungsmitteln aufzulösen oder mechanisch oder elektrisch zu permeieren. Die zerstörende Messung an den Zellspuren ohne Veränderung der Spenderzelle zur Erfassung von molekularen oder mikroskopischen Bestandteilen in den Zellspuren stellt einen besonderen Vorteile der Erfindung dar.

Die zellspurbasierten Analysen sind in besonderer Weise zur Kombination mit hochempfindlichen Meßtechniken geeignet. Diese umfassen beispielsweise die Fluoreszenz-Korrelationsanalyse zum Einzelmolekülnachweis und zur Bestimmung von Bindungskonstanten, die Massenspektrometrie zur Elementaranalyse und die konfokale Laserscanningmikroskopie. Genetisches Material in den Spuren kann z.B. über einen PCR-Prozeß amplifiziert werden, wodurch eine neuartige, die Spenderzelle in ihren physiologischen Zellen nicht beeinflussende Technik einer genetischen Analyse gegeben ist.

Für einzelzellbasierte Assays und Nachweisverfahren können auch die folgenden Prozeduren angewendet werden.

1. Die Menge der Zellrückstände wird als quantitatives Maß für die Stärke des Anhaftens der Spenderzelle an der Substratoberfläche und somit für die Menge bestimmter Bindungskomplexe in deren Membran erfaßt.
2. Die Spurenstruktur wird als Maß erfaßt, z.B. die Verhältnisse des Anteils an Filamenten zum Anteil an Verzweigungen, zum Anteil an Patches usw. (Vergleich von Zellspurgrundelementen in ihrer Quantität).
3. Die Materialzusammensetzung der Spuren wird als Maß erfaßt, z.B. Lipid/Proteinanteil, spezifisches Auftreten bestimmter Rezeptoren (u.a. der Immunglobulinfamilien), spezifisches Auftreten von Lipiden, Nukleotiden etc.
4. Charakterisierung zytoplasmatischer Rückstände, insbesondere genetischen Materials in den Rückständen der Zellen.
5. Vergleich von Änderungen in einem der Punkte 1 bis 4 nach Behandlung der spurerzeugenden Zelle (z.B. mit Pharmaka, toxischen Substanzen etc.).
6. Die Stabilität der Spur gegen mechanische, elektrische, akustische, optische oder chemische Behandlungen wird als Maß erfaßt.
7. Die Elementzusammensetzung der Spuren oder Teile derselben (z.B. Na, K, P...) werden als Maß erfaßt.
8. Passive elektrische Parameter der Zellrückstände, wie Impedanz, Durchschlagsfestigkeit, nichtlineares Verhalten

oder Erwärmung werden als Maß erfaßt.

9. Optische Parameter der Spuren werden als Maß erfaßt, wie Absorption, Transmission, nichtlineare Eigenschaften etc.
10. Mechanische Eigenschaften der Spuren, wie Elastizität, Plastizität usw. werden als Maß erfaßt.
11. Die Veränderung einer Zellspur durch eine nachfolgende Zelle der gleichen oder einer anderen Art wird als Maß erfaßt.
12. Die Spurcharakterisierung erfolgt nach einer Fixierung bzw. Kontrastierung, z.B. mittels hochauflösender Mikroskopverfahren (Rasterelektronenmikroskopie, AFM, SNOM etc.).
13. Ein Negativ oder anderes Duplikat oder eine Vervielfachung von Spurenteilen wie bei der PCR-Technik wird als Maß für den Vergleich benutzt.
14. Die Adhäsion anderer Materialien, wie hochspezifisch bindender Beads oder nm-Teilchen werden als Maß für den Vergleich erfaßt.

Die hier genannten Maße werden als für die Spenderzellen spezifischer Größen erfaßt, die bei gegebenen Vergleichswerten eine Charakterisierung der Spenderzelle oder bei Vergleich der Maße mit den entsprechenden Ergebnissen bei anderen Zellen zur Charakterisierung des unterschiedlichen Verhaltens der Zellen verwendet werden.

Im folgenden werden unter Bezug auf die Fig. 3 bis 7 Ausführungsformen erfindungsgemäßer Vorrichtungen erläutert. Dabei wird auf Einzelheiten der erfindungsgemäß eingesetzten Sub-

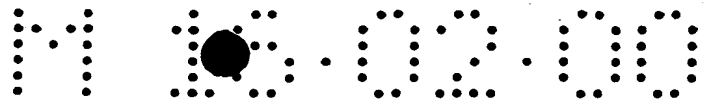


stratoberflächen eingegangen. Nicht dargestellt sind Einzelheiten einer Gesamtapparatur zur Zellspuruntersuchung, da diese in Bezug auf die Handhabung von Assays bzw. von mit Proben beschickten Substraten und die Anpassung an die jeweils gewünschten Untersuchungsmethoden an sich bekannt sind.

Die Fig. 3 und 4 sind schematische Schnittansichten von Substraten 31, 41, die jeweils mit einer Modifizierungsschicht 32 bzw. 42 im Bahn-Oberflächenbereich 35 bzw. 45 zur bevorzugten Anhaftung von Zellen und Hinterlassung von Zellspuren 34 bzw. 44 ausgestattet sind. Die Modifizierungsschicht 32 (bzw. 42) bietet Bindungsstellen an, an denen spezifisch ein vorbestimmtes, gesuchtes Zelloberflächenmolekül 33 (bzw. 43) ankoppeln kann. Eine Zelle, die derartige Moleküle in ausreichender Zahl besitzt, wird dementsprechend fester gebunden sein und mehr Spurenmaterial 34 (bzw. 44) bei ihrer Wanderung über das Substrat zurücklassen als andere Zelltypen. Die Erfassung der Menge des zurückgelassenen Materials (z.B. mit optischen Mitteln) liefert eine Aussage über den Gehalt des vorbestimmten Zelloberflächenmoleküls an der untersuchten Zelle. Die Zelle selbst wird durch die Messung nicht belastet.

Falls die Menge des Zellspurmaterials zu gering für eine sichere direkte Auswertung ist, so kann die Zellspurvermessung gemäß Fig. 4 modifiziert sein. Nach der Erzeugung der Zellspuren 44 werden diese mit der Lösung eines Fluoreszenzmarkers behandelt, der als Markermolekül 46 z.B. in die Lipidteile der Zellspur 44 unspezifisch eingebaut wird. Bei geeigneter Lichtanregung und Fluoreszenzmessung kann aus der Intensität des Fluoreszenzlichts auf die Zahl der Markermoleküle 46 und damit auf die quantitative Menge des Zellspurmaterials 44 rückgeschlossen werden.

Die Vorzugsbahn gemäß Fig. 1 bzw. der modifizierte Bahn-Oberflächenbereich 35 (oder 45) gemäß den Fig. 3 (oder 4)



können einfach oder mehrfach mit den verschiedensten Geometrien auf dem Substrat ausgebildet sein. Im folgenden werden gerade Vorzugsbahnen beschrieben. Es sind jedoch bei geeigneter Substratstrukturierung auch gekrümmte (z.B. kreisförmige) Vorzugsbahnen möglich.

Fig. 5 zeigt ein Beispiel für eine parallele Ausführung des in Fig. 1 erläuterten Grundprinzips mit einer Vielzahl parallel verlaufender, gerader Vorzugsbahnen.

Auf einem Substrat 51, das z.B. aus Glas, Silizium oder Kunststoff bestehen kann, sind die Zelladhäsion unterbindende Materialien 52 aufgebracht.

Dadurch entstehen eine Vielzahl von Bahnen 57 (Bahn-Oberflächenbereiche), auf denen sich Zellen adhärent bewegen können. Die Bahnen 57 reichen von Eingangsdepots 53 über Oberflächenfelder 55 bis hin zu Ausgangsdepots 58. Die Oberflächenfelder 55 sind so behandelt, daß bevorzugt Zellspuren erzeugt werden. Erreichen die Zellen die ebenfalls für die Adhäsion präparierten Ausgangsdepots 58, so werden sie dort festgehalten bzw. entnommen, um einer Kultivierung, Kryokonservierung oder einer anderen Prozedur unterzogen zu werden. Die Analyse der Spur kann mit allen gängigen Mikronachweisverfahren erfolgen (Fluoreszenz, Isotopenmarkierung, Elementanalyse etc.). Die Oberflächenfelder 55 mit den Zellspuren (nicht dargestellt) sind als Segmente der Bahnen 57 als Reihe, jeweils mit dem gleichen Abstand von dem jeweiligen Eingangsdepot 53 angeordnet. Dies erleichtert die parallele, simultane Auswertung der Zellspuren.

In Fig. 6 ist eine Substratoberfläche in Form eines Mikrosystems gezeigt, die in ähnlicher Weise in verschiedene Oberflächenbereiche kompartmentiert wurde, wie das in Fig. 5 der Fall ist. Das Substrat besteht hier jedoch entweder aus zwei Teilen 61a, 61b oder einem Teil mit einer Sollbruchstelle 61c. Auf den

Feldern 65 hinterlassen die Zellen Spuren. Sind sie auf ihrer Wanderung über das Substrat in den Ausgangsdepots 68 angekommen, so wird das Teil 61b entfernt oder abgebrochen. Wie im linken Teil von Fig. 6 gezeigt ist, befinden sich dann die Spuren und Zellen auf jeweils getrennten Substraten 31 und 32, so daß sie auf verschiedene Weise weiterbehandelt werden können.

In Analogie zu diesen Ausführungen lassen sich Oberflächen mit weitaus mehr Zellwegen erzeugen, in denen parallel die Spuren vieler Zellen so, daß sie eindeutig zuzuordnen sind, erzeugt und charakterisiert werden können.

Fig. 7 zeigt eine Substratoberfläche, die derart strukturiert ist, daß sich zwei Vorzugsbahnen, die für die Wanderung der Spenderzellen eingerichtet sind, kreuzen. Auf dem Substrat 71 verlaufen die Bahnen 77a und 77b im wesentlichen senkrecht zueinander. Im Kreuzungsbereich 75 ist eine Oberflächenmodifizierung oder -strukturierung zur Förderung des Anhaftens von Zellspuren angebracht, wie sie oben erläutert wurde. Außerhalb der Bahnen 77a bzw. 77b ist das Substrat 71 so strukturiert, daß dort keine Zellwanderung stattfindet und keine Zellspuren anhaften.

Mit der in Fig. 7 gezeigten Anordnung lassen sich vorzugsweise Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen untersuchen. Es kann z.B. vorgesehen sein, daß zunächst die Zelle 76a über den Bereich 75 wandert und dort Zellspuren hinterläßt. Anschließend wandert die Zelle 76b über denselben Bereich 75 mit den vorhandenen Zellspuren. Mit einem optisch-mikroskopischen Verfahren oder einem anderen Untersuchungsverfahren wird danach erfaßt, ob die Spuren der ersten Zelle 76a durch die zweite Zelle 76b verändert, überlagert oder entfernt wurden. Es kann ferner erfaßt werden, ob geometrische Korrelationen zwischen den Zellspuren auftreten, d.h. ob die Nachfolgezellen den Spuren der

Vorgängerzellen folgen oder diese gerade meiden. Daraus lassen sich wiederum zellbasierte Assays für die Medizin, Biotechnologie und Pharmazie mit hoher Spezifik entwickeln. Ein Substrat mit gekreuzten Bahnen läßt sich wiederum zur Erzielung einer Parallelverarbeitung vielfach auf einem gemeinsamen Träger ausbilden.

Die Herstellung eines erfindungsgemäßen Substrats erfolgt vorzugsweise derart, daß zunächst ein Trägermaterial mit einer Beschichtung versehen wird, die für die Zellwanderung und -adhäsion ungünstig ist (z.B. stark negativ geladene Moleküle). Anschließend wird diese Beschichtung entsprechend dem gewünschten Verlauf der Vorzugsbahnen durch Abtragen strukturiert, so daß das Trägermaterial entsprechend bestimmter geometrischer Formen frei liegt, die dann die Vorzugsbahnen bilden. Anschließend erfolgt anwendungsabhängig die Segmentierung der Vorzugsbahn, d.h. die Aufbringung einer Strukturierung und/oder Modifizierung des Trägermaterials zur verstärkten Zelladhäsion.

Die Bahnbreiten sind vorzugsweise an die charakteristische Ausdehnung einer adhärierten Zelle angepaßt und betragen rd. 50 µm. Die Bahnlängen können ebenfalls anwendungsabhängig ausgewählt werden. Sie betragen z.B. 3 bis 4 charakteristische Zelldurchmesser (d.h. rd. 150 bis 200 Mikrometer) bis hin zu größeren Längen im Millimeterbereich.

M 16.02.00

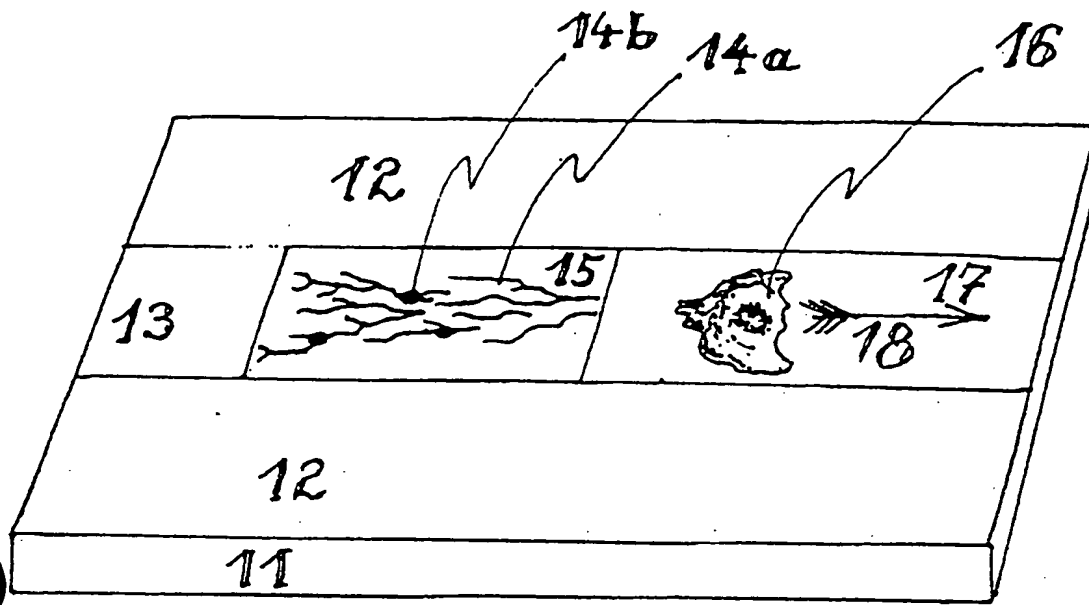


Fig. 1

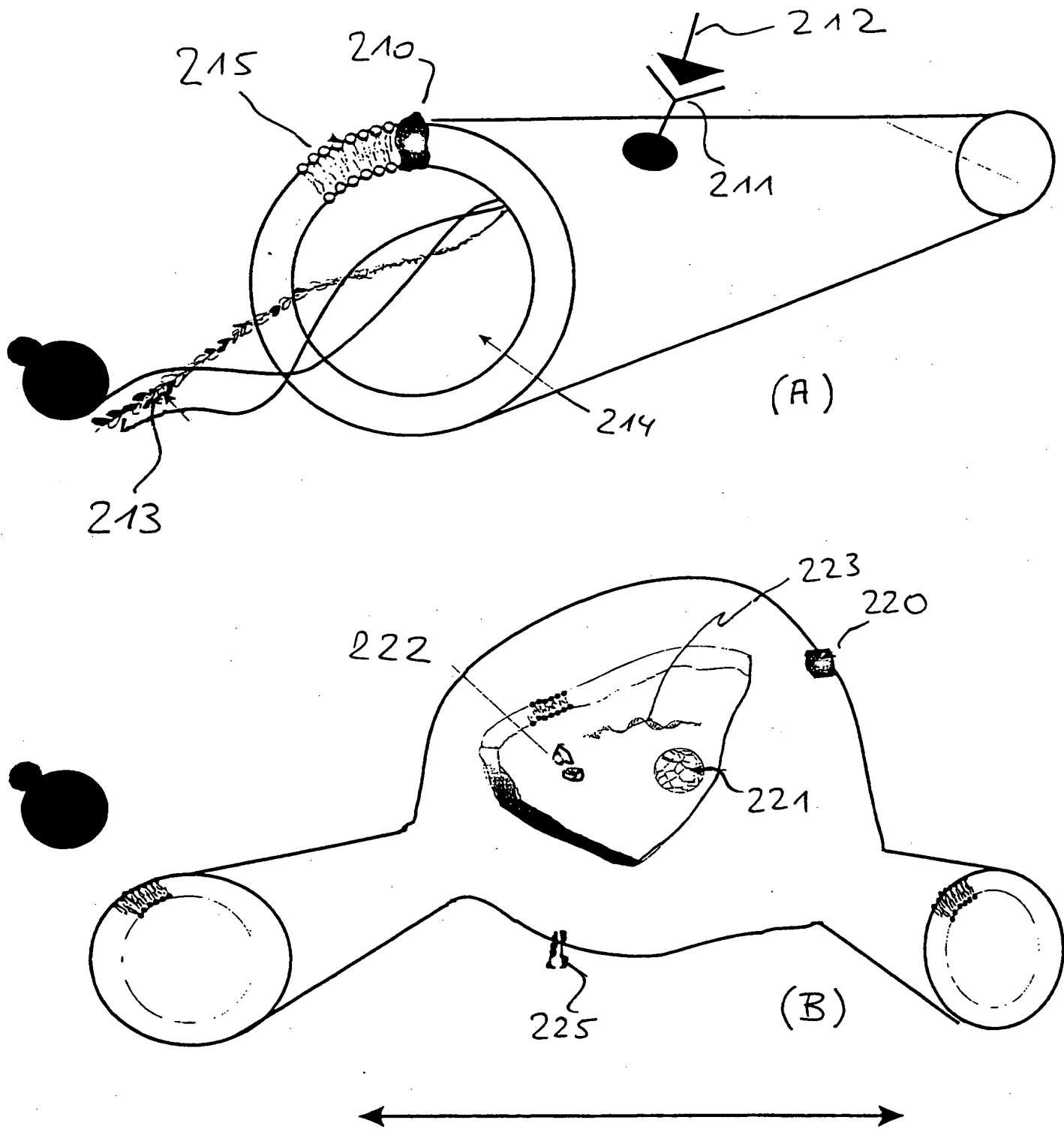


Fig. 2

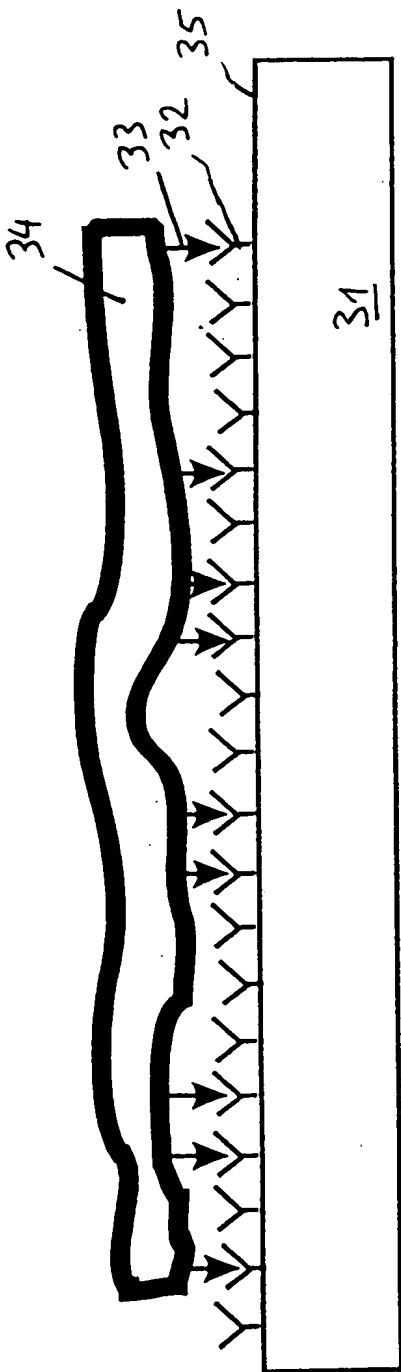


Fig. 3

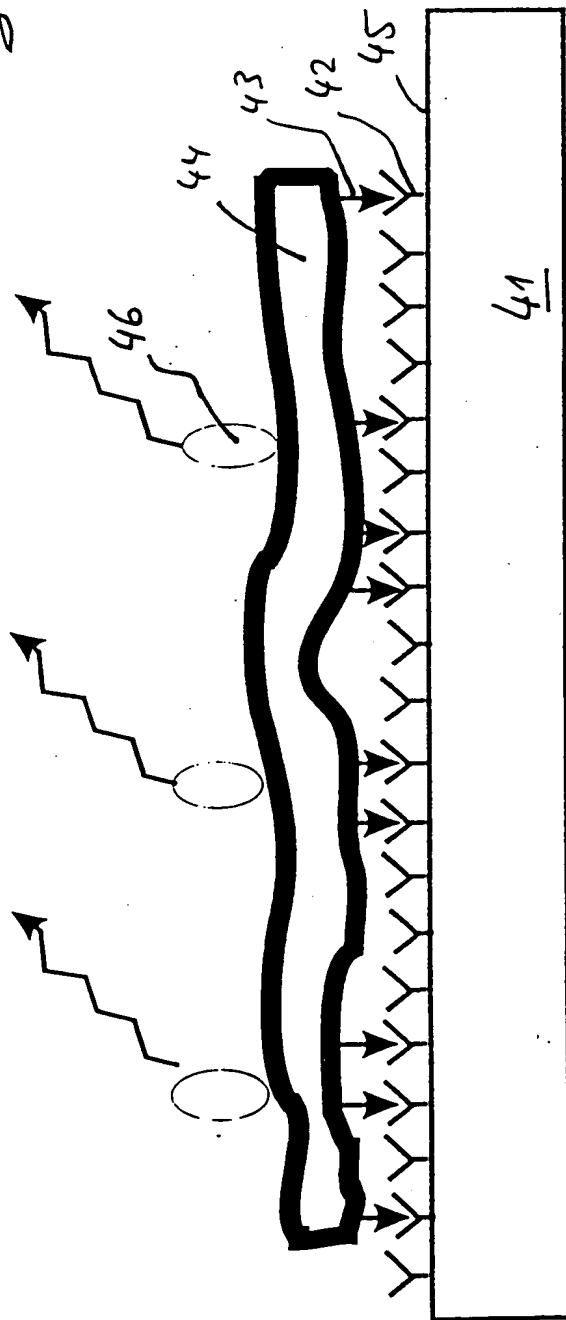


Fig. 4

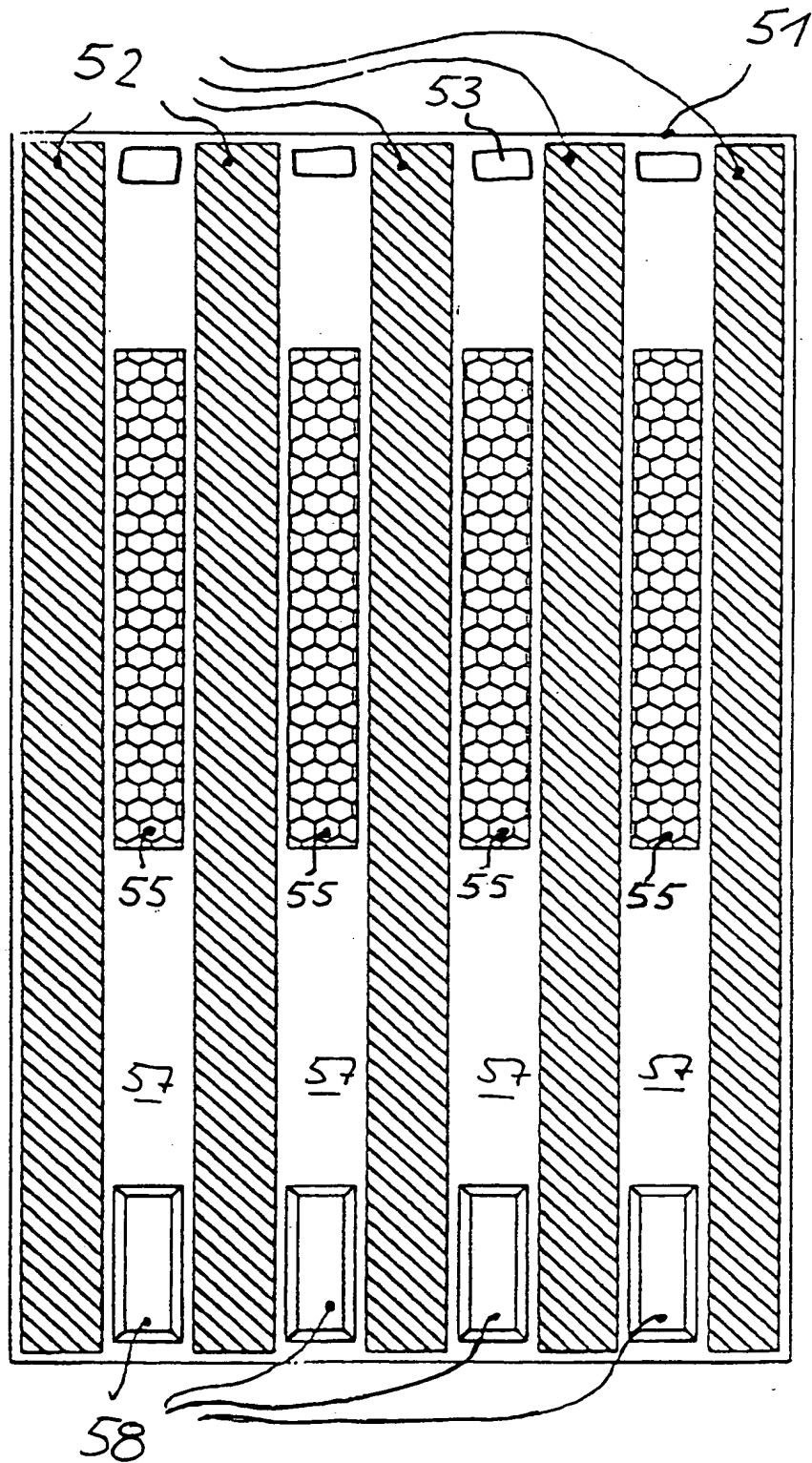


Fig. 5



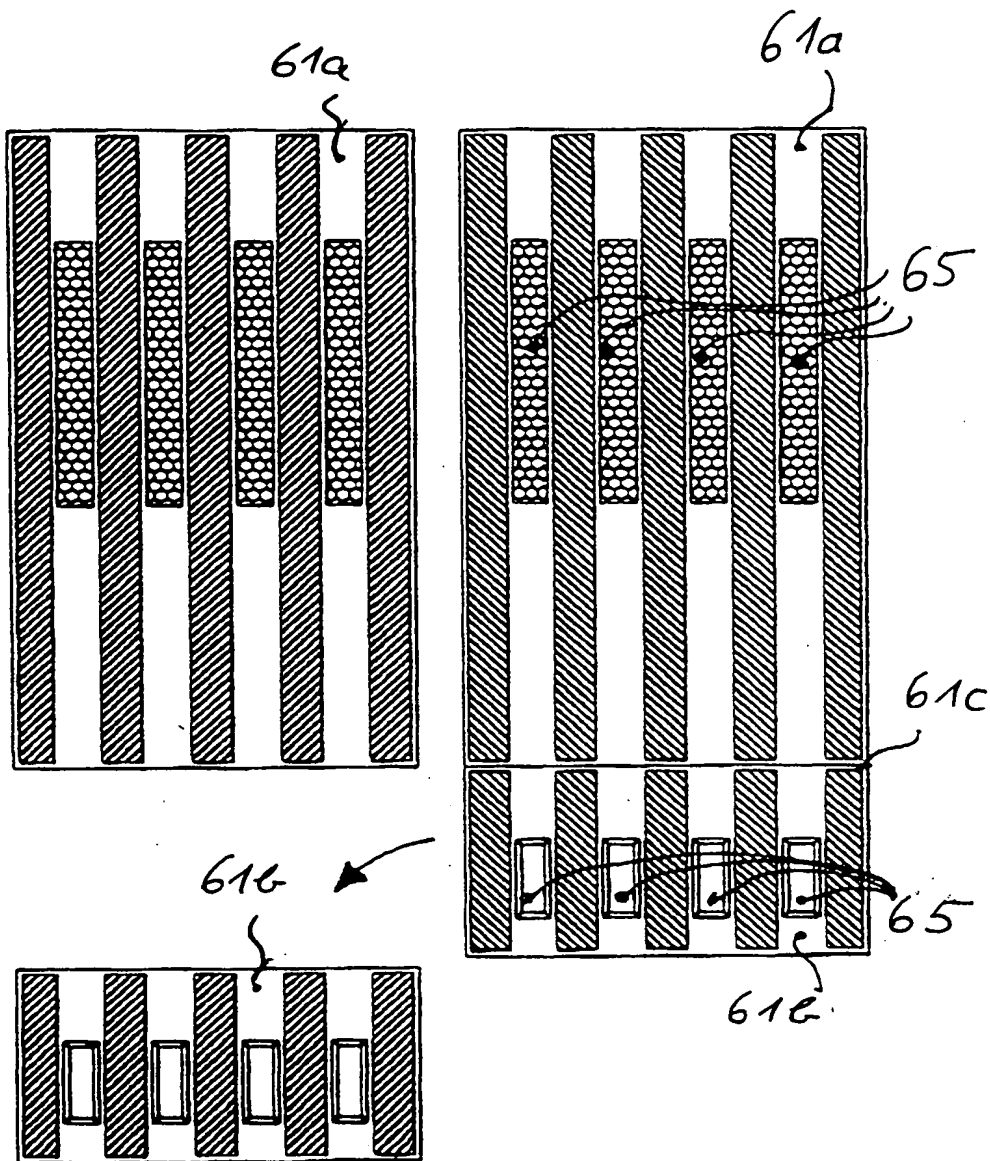


Fig. 6

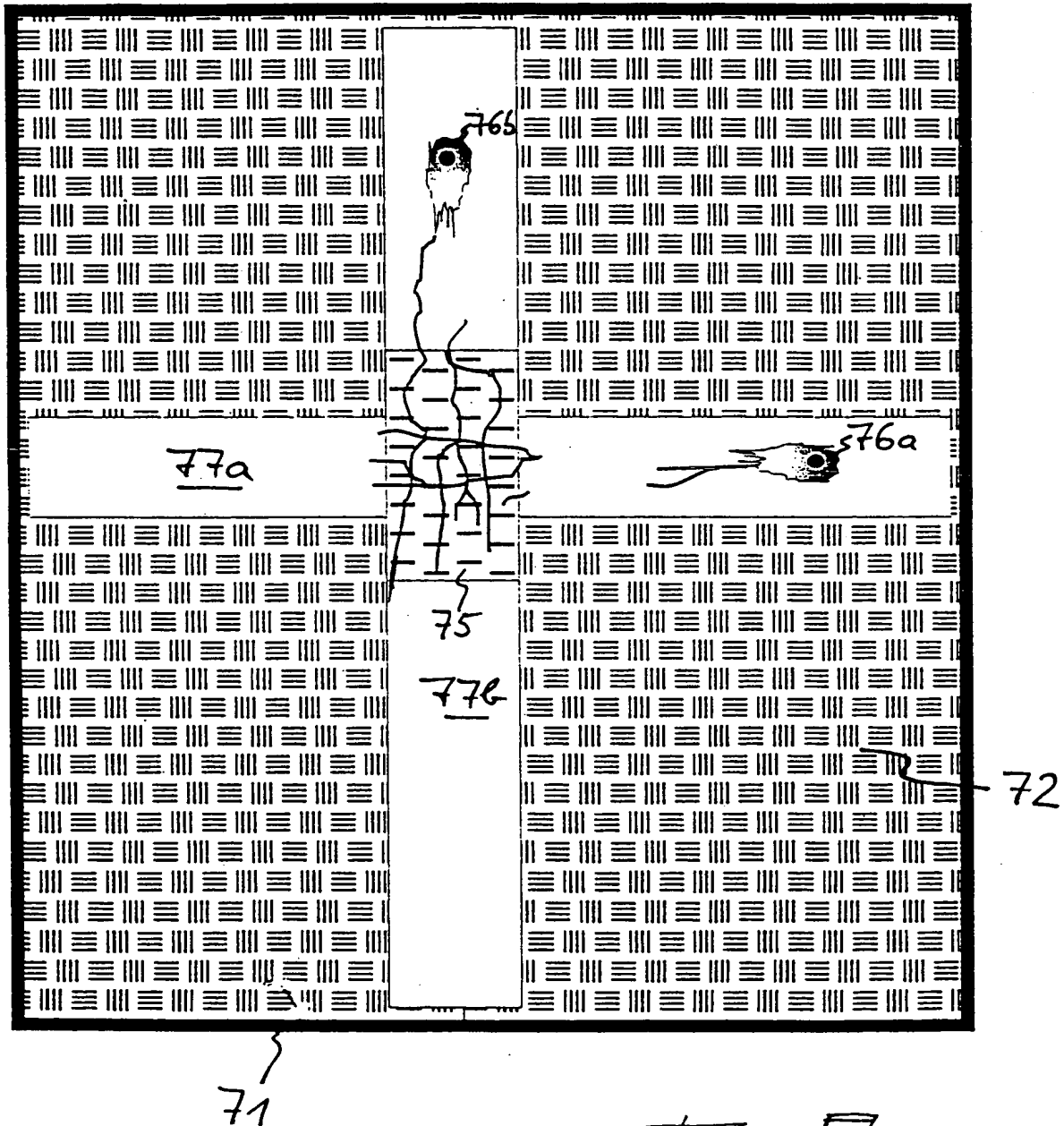


Fig. 7